

MÉTODOS USADOS EN COLOMBIA PARA EL ESTUDIO DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA (1)

Por Manuel Roca García y Marston Bates.

Introducción.

Con el hallazgo hecho por Stokes, Bauer y Hudson (1928) acerca de la susceptibilidad del *Macacus rhesus* al virus de la fiebre amarilla, se inició la era de investigación epidemiológica de dicha enfermedad, facilitándose el estudio de este virus en el laboratorio, a saber: sus propiedades biofísicas y su comportamiento en el huésped y en el único vector conocido hasta entonces, el mosquito *Aedes aegypti*; pero los trabajos de laboratorio fueron en esa época muy limitados debido al alto costo del rhesus. El descubrimiento hecho por Theiler (1930) de la susceptibilidad del ratoncito blanco, mediante la inoculación intracerebral del virus, hizo posible, tanto en el laboratorio como en el campo, la investigación en grande escala, por decirlo así, de todas las incógnitas relacionadas con el virus mismo y con la epidemiología de la enfermedad.

El nuevo aspecto epidemiológico-selvático de la fiebre amarilla, ya sospechado aquí en Colombia por el Dr. Roberto Franco en los primeros años de este siglo y más tarde por Kerr y Patiño Camargo (1932) que culminó con los estudios hechos durante la epidemia del Valle de Chanaan, en el estado del Espíritu Santo, Brasil (Soper *et al* 1933), cambió totalmente el aspecto epidemiológico de la enfermedad, y nuevas incógnitas surgieron en cuanto a vector y reservorios. La confirmación hecha en 1934 y 1935 de un foco endémico de fiebre amarilla selvática en la Intendencia del Meta, en las zonas de Restrepo, Vi-

(1) Los estudios y observaciones en que se basa este trabajo se llevaron a cabo bajo los auspicios del Instituto de Estudios Especiales "Carlos Finlay" del Ministerio de Trabajo, Higiene y Previsión Social en cooperación con la División Sanitaria Internacional de la Fundación Rockefeller.

llavicencio y Acacias (Boshell, 1938) determinó el establecimiento de un laboratorio en Villavicencio en el año de 1938. Este laboratorio estaba equipado con los elementos y materiales necesarios para realizar estudios de virus, con el objeto de efectuar investigaciones sobre la epidemiología, o mejor dicho, sobre la "Historia Natural" de la fiebre amarilla selvática y, asimismo, confirmar y ampliar por medio de investigaciones de laboratorio los hallazgos hechos en el curso de trabajos realizados en la selva misma.

Las investigaciones preliminares realizadas tanto en Colombia como en el Brasil sobre la presencia de anticuerpos de fiebre amarilla en algunos mamíferos silvestres, procedentes de las zonas endémicas, señalaron que las especies de los grupos de primates y marsupiales eran probablemente los huéspedes más importantes. Asimismo, la confirmación en el laboratorio de la capacidad transmisora de algunos mosquitos selváticos hizo sospechar que el virus se mantenía mediante intercambio de infección de mamífero-mosquito-mamífero. Con el fin de evaluar más cuidadosamente la potencialidad de cada una de las especies de mamíferos en los supuestos ciclos naturales, se emprendieron estudios en el laboratorio sobre la susceptibilidad al virus amarílico de las especies más comunes.

La mayor parte de los estudios de susceptibilidad fueron hechos mediante la inoculación de dosis conocidas de virus, investigando la presencia de virus circulante y el desarrollo de anticuerpos. Los resultados concernientes a esta clase de trabajos en marsupiales fueron publicados por Bugher, Boshell, Roca y Gilmore (1941), y por Bates (1944b).

Más tarde por los estudios realizados en la selva y publicados por Bugher, Boshell, Roca y Osorno (1944) se comprobó que el virus de la fiebre amarilla se mantenía en la naturaleza mediante ciclos constantes entre mamíferos y zancudos, y que el vector principal era la especie de zancudo denominado *Haemagogus capricornii*, identificado más tarde como *Haemagogus spegazzinii falco* (Kumm, Osorno y Boshell, 1946); Bates y Roca (1945) confirmaron en el laboratorio los estudios anteriores mediante el establecimiento de ciclos de transmisión entre el mosquito *Haemagogus* y micos indígenas. Aprovechando el desarrollo de esta técnica, pudo evaluarse la susceptibilidad de algunas especies de marsupiales, (Bates y Roca, 1946).

El presente artículo tiene por objeto describir los métodos y técnicas usados en el curso de los estudios epidemiológicos realizados en el laboratorio de Villavicencio, puesto que lo concerniente a estas técnicas se halla muy disperso en la literatu-

ra, y no hay en la actualidad ninguna publicación que las presente en conjunto.

Virus amarílico.

Este es un virus filtrable, de molécula muy pequeña; su tamaño oscila entre 17 y 28 milésimas de micra (milímicras). Se multiplica fácilmente en los órganos de los animales susceptibles y se cultiva *in vitro* en medios especiales en presencia de células vivas, principalmente embrionarias. Es muy sensible a los agentes físicos y químicos: una temperatura de 55° C., por espacio de pocos minutos, es suficiente para destruirlo; asimismo el cloruro de sodio contenido en el suero fisiológico lo destruye en pocas horas, y aún el agua destilada produce el mismo efecto; pero esta acción se inhibe por algunas horas si se agrega un 10% de sustancia proteica. El vehículo que mejores resultados ha dado para la manipulación del virus en el laboratorio, que se conoce con el nombre común de "diluyente", es una solución compuesta de suero fisiológico más un 10% de suero normal humano o de mono (rhesus), es decir, sueros de personas o monos que no hayan sufrido la enfermedad ni hayan sido vacunados. Se conserva muy bien mediante la desecación al vacío y mantenido a una temperatura baja (no mayor de 4° C.).

El virus de fiebre amarilla aislado del hombre corresponde al llamado *virus pantrópico*, que posee propiedades *viscero* y *neurotrópicas*. La inoculación de este virus por vía extra-neural al rhesus generalmente ocasiona la muerte con destrucción del tejido hepático, mientras que inoculado intracerebralmente al ratón blanco produce una encefalitis después de un período de incubación bastante largo. El virus de fiebre amarilla es muy susceptible de modificarse o adaptarse; es así como el *virus pantrópico*, sometido a continuos pases de ratón a ratón mediante inoculación intracerebral, ha llegado a disminuir su viscerotropismo en tal forma que ha perdido la capacidad de producir infección visceral tanto en el hombre como en el rhesus; pero en cambio su patogenicidad para el ratón se ha aumentado, produciendo la muerte de este animal en 4-5 días. El virus "fijado" por tal procedimiento es conocido como "neurotrópico". La cepa "standard" de este tipo de virus es el *Neurotrópico Francés*, el cual fue aislado en Senegal (Africa) por los investigadores Mathis, Sellards y Laigret. Originalmente esta cepa fue aislada en rhesus, pero más tarde modificada por medio de pases en series en ratones blancos (Theiler, 1930). Una cepa de vi-

rus viscerotrópico muy empleado en estudios de laboratorio es el *Asibi*, especialmente virulento para el rhesus; este virus fue aislado por Bauer y Mahaffy de un caso benigno de fiebre amarilla (el negro *Asibi*), contraída en Costa de Oro (Africa). El llamado virus *17 D.*, corresponde al virus viscerotrópico *Asibi*, modificado por medio del cultivo *in vitro* en subcultivos sucesivos en medios que contenían alternadamente tejidos de embrión total de ratón, tejidos de embrión total de pollo y tejidos de embrión de pollo sin sistema nervioso central; después de 204 subcultivos el virus perdió completamente sus propiedades viscerotrópicas, conservando su poder antigénico específico y no siendo ya *patógeno* para el hombre ni para el rhesus en inoculación extra-neural. Este es el virus-vacuna que ha servido para inmunizar contra la fiebre amarilla a millones de personas.

Ratón blanco.

El hallazgo de la susceptibilidad del ratón blanco al virus de la fiebre amarilla hizo posible el establecimiento de técnicas de laboratorio por medio de las cuales se pudo controlar lo siguiente: vitalidad, dosificación, anticuerpos específicos e identidad del virus. Asimismo se pudo estimar la susceptibilidad de los animales experimentados, mediante la medida de la cantidad de virus presente en el torrente sanguíneo durante la infección, y el grado de inmunidad alcanzado después de ella. También se pudo seguir paso a paso el comportamiento del virus en el estudio de las varias especies de mosquitos sospechosas de ser posibles vectoras.

La raza de ratones blancos usada en los trabajos de fiebre amarilla realizados en Colombia corresponde a la albino-suiza, llevada y establecida en el Instituto Rockefeller en 1926 por la Doctora Clara Lynch. No todas las razas de ratones blancos son 100 por 100 susceptibles al virus amarílico como lo han demostrado estudios realizados por Sawyer y Lloyd (1931), y por Lynch y Hughes (1936).

La inoculación del virus amarílico al ratón blanco produce en éste una encefalitis mortal; sin embargo, la susceptibilidad de este animal presenta algunas modalidades en relación con la edad, la vía de inoculación y cepa de virus usada. De acuerdo con la índole de la investigación que se adelante, los ratones son usados desde la edad de 3 hasta 60-70 días, porque más tarde, aún a la inoculación intracerebral, presentan alguna resistencia y los resultados no son muy satisfactorios. De 3 a

6 días son susceptibles a todas las modalidades del virus amarílico (*pantrópico*, *viscerotrópico*, *neurotrópico* y *17 D*), ya mediante la inoculación subcutánea, intracerebral o por medio de las picaduras de mosquitos vectores infectados (Bugher, 1941). Posteriormente son susceptibles a todas las modalidades del virus, pero sólo usando la vía intracerebral y, principalmente, al virus neurotrópico. De los 9 a los 21 días son susceptibles por la vía intraperitoneal, inoculando grandes dosis de virus neurotrópico (Whitman, 1943); y después de esta edad también son susceptibles usando la misma técnica, pero produciendo antes de la inoculación una irritación cerebral mediante la inyección de 0.03 c.c. de una suspensión de almidón al 2% en suero fisiológico.

Todas las manipulaciones de rutina del virus se practican con ratones adultos y, por lo tanto, utilizando la vía intracerebral. Los ratones son anestesiados con éter sulfúrico (Fig. 2) y la inoculación (Fig. 3) se hace con jeringa de tuberculina de 1/4 o de 1/2 c.c., usándose una aguja hipodérmica de calibre 27 x 1/4 de pulgada de largo. El sitio de preferencia para la inyección corresponde al punto medio de una línea que va del ojo derecho a la oreja del mismo lado; pero la inyección puede ser practicada en el otro hemi-cráneo o en la parte media, y la cantidad inoculada es de 0.03 c.c.; una mayor cantidad produce la muerte por compresión cerebral. En investigaciones especiales del comportamiento del virus pantrópico en los experimentos de transmisión se usan frecuentemente ratones de 5 a 7 días de edad, inoculados intracerebralmente; éstos reciben la misma cantidad, es decir, 0.03 c.c. La tolerancia de la inoculación es satisfactoria, y la mortalidad por traumatismo es semejante a la encontrada en los ratones adultos inoculados por la misma vía. Cuando se inoculan ratones menores de 21 días son conservados con la madre (los ratones son desmamados a los 21 días de edad). Los ratones son inoculados en grupos de 6, los cuales son considerados como una unidad en la experimentación; cada grupo es mantenido en una caja de un tamaño de 16 x 25 x 12 cms. (Fig. 4). Esta caja lleva el número de orden que corresponde a la tarjeta Record del grupo inoculado y en la cual van consignados los detalles de dicho experimento, y que permite, por tanto, la observación diaria del grupo correspondiente. Cuando se ha usado virus neurotrópico, los ratones principian a enfermar del 4º al 5º día de inoculación y a veces un poco más tarde, según la dosis de virus inoculada; la parálisis se presenta muy pronto (Fig. 1) y los ratones mueren entre el 5º y el 10º día. Cuando se trata de virus *pan-*

trópico o *viscerotrópico*, el período de incubación es mucho mayor, generalmente de 7 a 12 días, y en muchas ocasiones más; el período de la enfermedad es más largo y no siempre la encefalitis es fatal.

De acuerdo con el experimento que se adelante, los grupos de ratones inoculados son observados diariamente por un tiem-

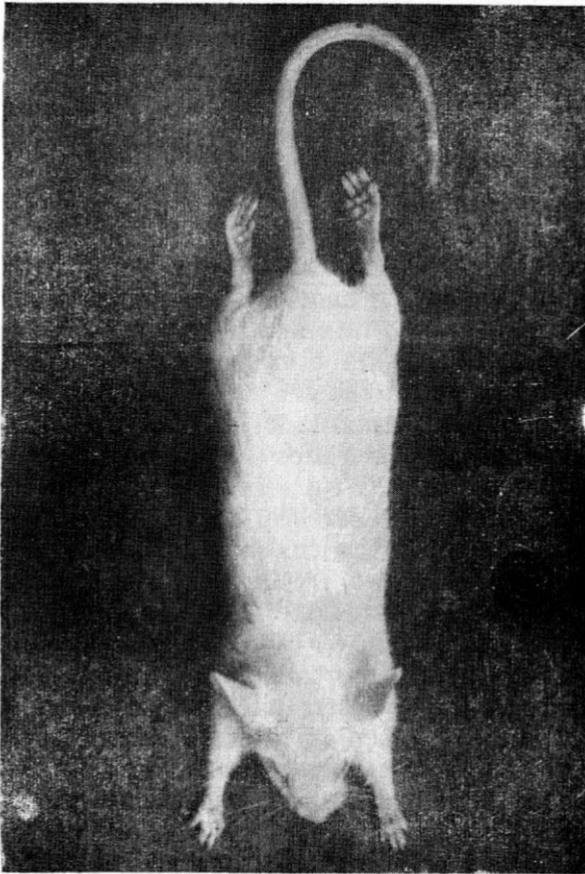


Fig. 1. — Ratón que presenta parálisis de las extremidades posteriores, ocasionada por infección producida por el virus de la fiebre amarilla.

po mínimo de 10 días hasta un máximo de 30. Los ratones que mueren dentro de los cuatro primeros días después de la inoculación son descartados del experimento, pues seguramente la muerte es debida a traumatismo o a otra causa distinta del virus inoculado. La lectura u observación diaria de los ratones inoculados se indica con signos convencionales (véase

Fig. 13), expresándose al mismo tiempo la lectura por medio de un quebrado, cuyo numerador indica el número de ratones enfermos o moribundos y el denominador, el número de ejemplares que se encuentren vivos. El resultado final es expresado también en la forma de quebrado, cuyo numerador indica ei

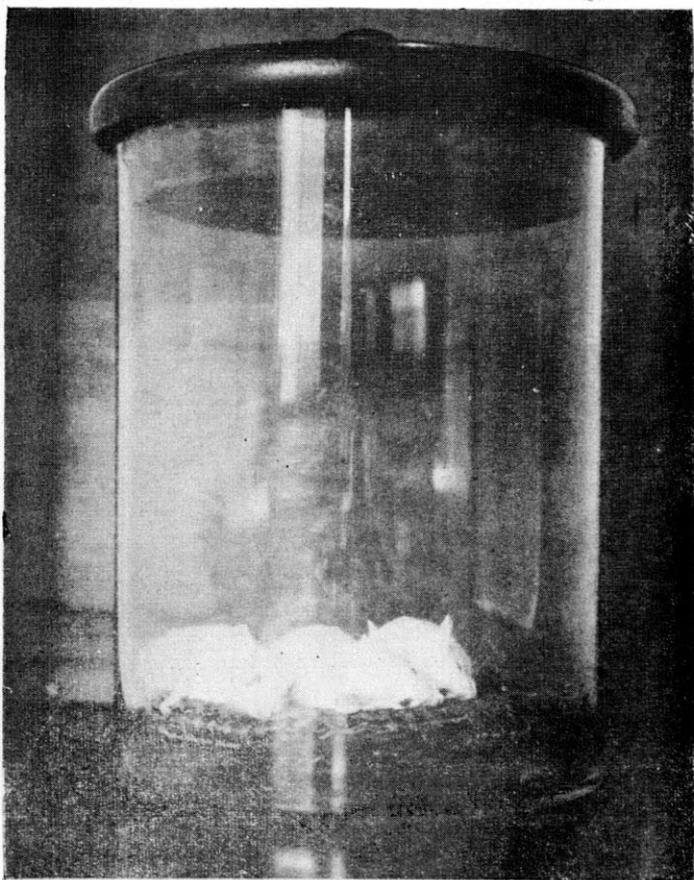


Fig. 2. — Bocal de vidrio donde aparecen tres ratones anestesiados con éter, listos para ser inoculados.

número de ratones que murieron a consecuencia de la infección y el denominador, el número de ratones inoculados.

Titulación del Virus.

Como ya dijimos, el hallazgo de la susceptibilidad del ratón blanco al virus de la fiebre amarilla, mediante la inocula-

ción intracerebral, permite medir o titular la potencialidad de dicho virus contenida en cualquier vehículo; así, por ejemplo, puede apreciarse la potencialidad del virus contenida en el suero sanguíneo del hombre enfermo o en el de uno de los animales susceptibles infectados, como también, el título o potencialidad del virus multiplicado en el cerebro de ratón que ha sido inoculado intracerebralmente, etc. La titulación se practica por medio de la inoculación intracerebral a ratones blancos adultos, de diluciones al décimo, en serie de la suspensión



Fig. 3. — Técnica de inoculación intracerebral con jeringa de tuberculina

madre del virus, usándose para cada dilución, por lo menos, un grupo de ratones. El "end-point" o punto final de una titulación corresponde a aquella dilución del virus que produce una mortalidad del 50% de los ratones inoculados.

Para mejor comprensión vamos a dar un ejemplo de una titulación: se trata de hacer la titulación del virus contenido en el suero sanguíneo de un rhesus inoculado. Se preparan extemporáneamente varios tubos que contengan 2.7 c.c. de diluyente (solución salina al 10% de suero normal de mono o humano) y se rotulan de 1/10 a 1/1.000.000. Sangrado el rhesus y

obtenido el suero, éste, para la finalidad de la titulación, corresponde a la dilución 0; tomando 0.3 c.c. del suero se pone en el tubo marcado 1/10 y se obtiene la dilución señalada; luego se toman 0.3 c.c. de esta dilución y se pasa al tubo siguiente marcado con 1/100, obteniéndose dicha dilución, y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 1/1.000.000; con cada una de estas diluciones se inocula un grupo de ratones adultos. Observados los ratones durante el tiempo requerido y tabulados los

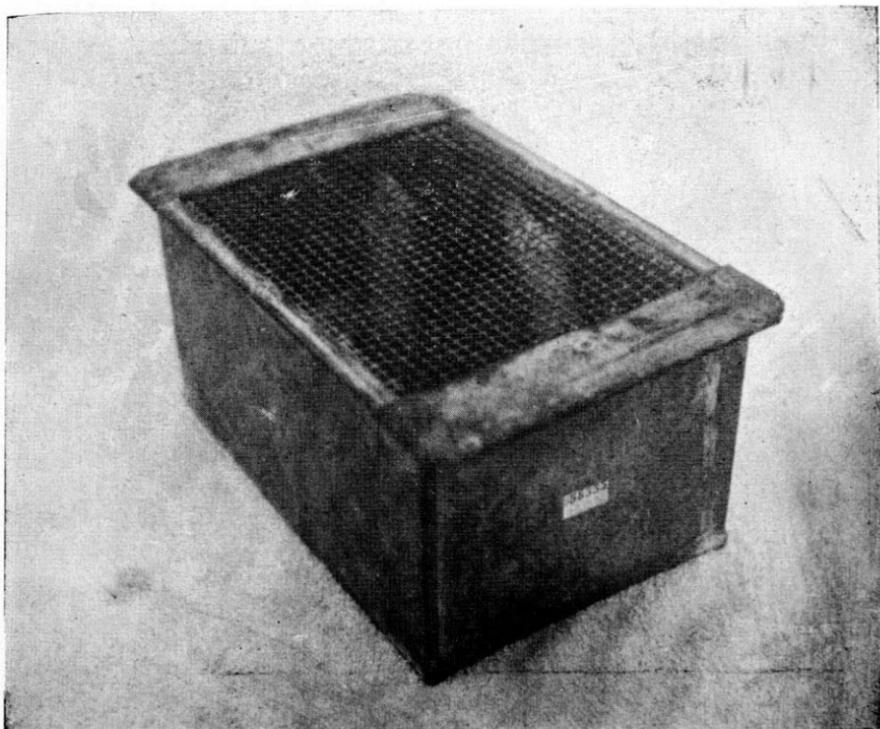


Fig. 4. — Caja metálica con tapa de malla donde se guardan los ratones infectados.

resultados podrá conocerse el título del virus en el suero del animal investigado; así por ejemplo, supongamos que se obtuvo el siguiente resultado:

Diluciones:	1/10	1/100	1/1000	1/10.000	1/100.000	1/1.000.000
Resultado:	6/6	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6

es decir, que todos los ratones murieron de las diluciones 1/10 a 1/10.000; que en la dilución 1/100.000 sólo murieron 3 ratones

de los 6 inoculados, y que en la siguiente dilución no murió ningún ratón. Esto quiere decir que el título del virus es 1:100.000, dilución que mató el 50% de los ratones inoculados. lo cual se traduce diciendo que el virus contenido en el suero del rhesus investigado tiene una concentración tal, que diluido al 1 x 100.000 es capaz de matar la mitad de los ratones inoculados, lo que en otras palabras podrá decirse que 0.03 c.c. (cantidad inoculada intracerebralmente a cada ratón) del suero del rhesus tienen 100.000 dosis mínimas letales para el ra-

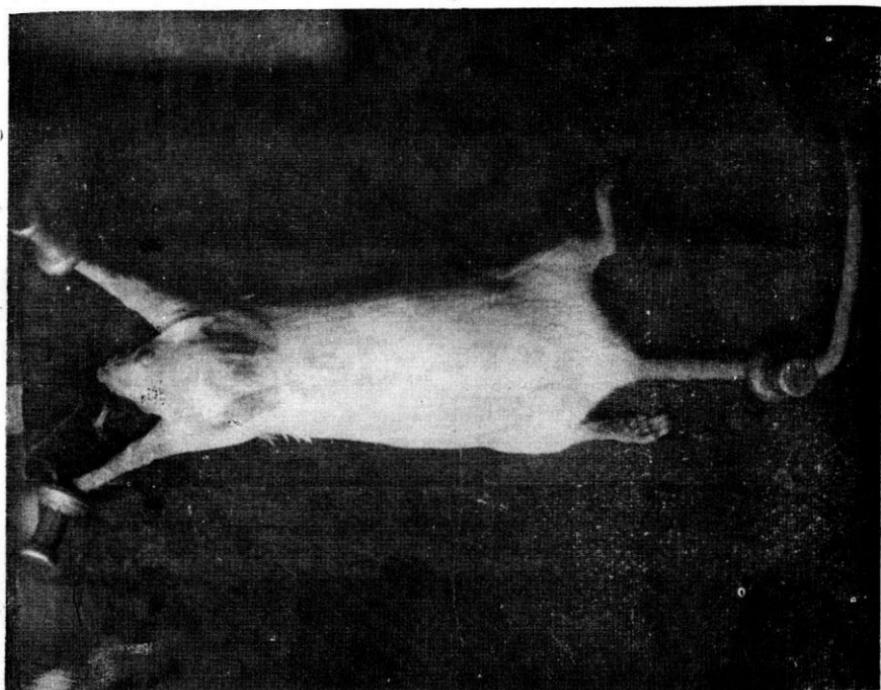


Fig. 5. — Ratón muerto por la acción del cloroformo, que muestra la colocación adecuada para extraerle el cerebro.

tón, lo que se expresa abreviadamente así: 100.000 D.M.L.R. En la práctica corriente, las diluciones siempre se expresan en forma logarítmica, como por ejemplo: las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000, se expresan: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; para expresar el título anterior sería: $1:10^{-4}$. Mas son muy pocas las veces que en las titulaciones es posible obtener resultados como el expresado en el ejemplo anterior, es decir, que el *punto final* se encuentre precisamente en una de las diluciones, siendo necesario entonces aplicar el método de Reed y Muench (1932), que

comprende un cálculo logarítmico, el cual no es necesario resumirlo en el presente artículo.

Prueba de Especificidad.

Tiene por objeto esta prueba el confirmar si el virus aislado es o nó el de la fiebre amarilla. Esta confirmación puede hacerse indirecta o directamente. En el primer caso el virus es inoculado a algunos de los animales altamente susceptibles a la fiebre amarilla, tales como el rhesus o el Aotus (este último, mico americano conocido con el nombre común de "mico noc-

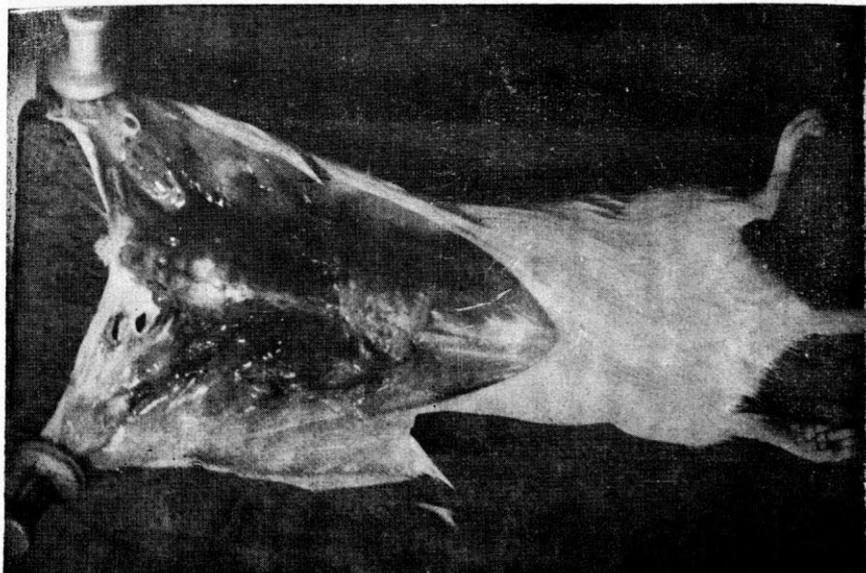


Fig. 6. — Ratón con la piel disectada y extendida debidamente para extracción del cerebro.

turno"); si el animal muere, se pueden comprobar las lesiones típicas de este virus en el hígado; si no muere, se puede, mediante la correspondiente prueba de protección, comprobar la formación de anticuerpos específicos en el animal inoculado. Cuando no se dispone de estos animales o se desee ser más económico, puede también usarse el curí; en este caso es necesario inocular varios ejemplares y usar dosis grandes de virus porque este animal no es tan susceptible como los primates, pero reacciona muy bien en la formación de anticuerpos.

La forma directa corresponde a la prueba propiamente dicha de especificidad. Esta prueba consiste en la neutralización del virus aislado por un suero ya conocido que neutraliza el virus legítimo de la fiebre amarilla. Esta es la forma generalmente usada cuando el virus ha sido aislado en ratones. Es conveniente hacer unos cuantos pases en series, pues es necesaria una ligera adaptación neurotrópica del virus para el éxito de esta prueba. La técnica consiste en la inoculación intracerebral a ratones blancos adultos, de mezclas de suero inmune de fiebre

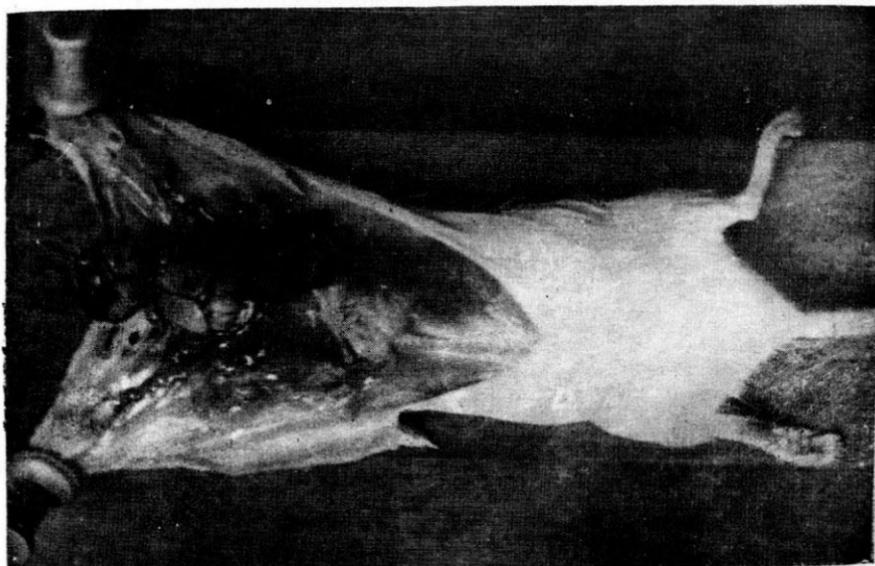


Fig. 7. — Cráneo cortado con tijeras, que muestra el cerebro listo para ser extraído.

amarilla, en partes iguales con diluciones al décimo en serie del virus aislado, después de haber sido incubadas dos horas a la temperatura de 27° C. Como control se inoculan mezclas exactamente iguales a las anteriores, en las cuales se usa suero normal. Los ratones son observados durante 14 días, y tabulados los resultados puede apreciarse si el virus en mención es o no el de la fiebre amarilla. Para mejor comprensión ponemos un ejemplo positivo:

Suero inmune de mono mezclado				
en partes iguales con virus de	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
la correspondiente dilución - Resultado:	1/6	0/6	0/6	0/6

Suero normal de mono mezclado				
en partes iguales con virus de	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
la correspondiente dilución - Resultado:	6/6	4/6	3/6	0/6

Como puede apreciarse en el resultado de la inoculación de las mezclas de suero inmune y virus, en las diluciones 10⁻² a 10⁻⁴ solamente murió un ratón en la primera dilución, mientras que en los controles normales, en la primera dilución 10⁻² murieron todos los ratones, 4 de 6 en la siguiente y en la 10⁻⁴, 3 de 6; se ha puesto así de manifiesto, el poder neutralizante del suero inmune en presencia de su antígeno específico. Cuan-

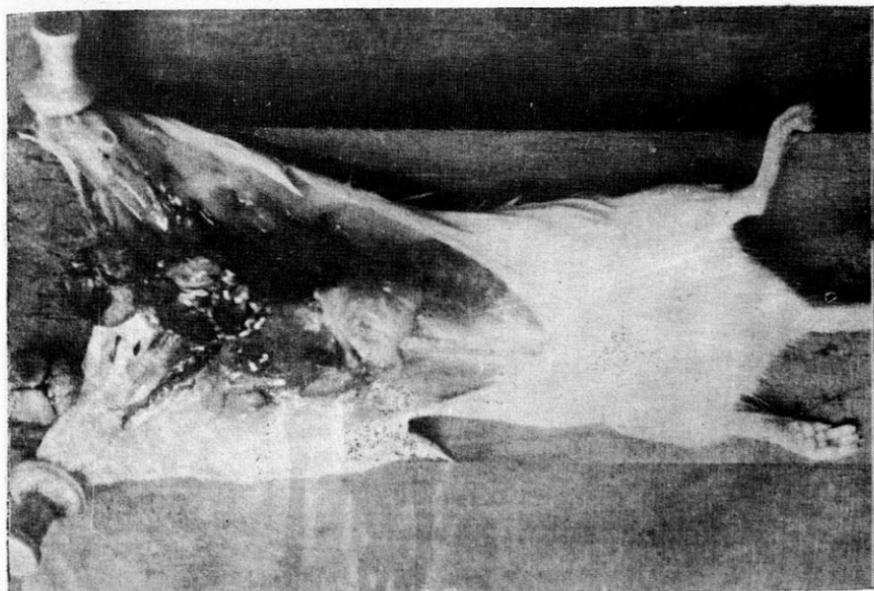


Fig. 8. — Cerebro extraído intacto; en los experimentos, siempre se coloca el cerebro directamente en una caja de petri esterilizada.

do se encuentra muy poca diferencia debido al bajo título de virus, la prueba es declarada no satisfactoria y se hace necesario una repetición. Cuando los resultados de ambas mezclas son casi parecidos, demostrándose que el suero inmune no ha obrado como suero neutralizante, la prueba es negativa, y quiere decir que se está en presencia de un virus que no es el de la fiebre amarilla; pero siempre es prudente repetir la prueba para descartar cualquier error.

Prueba de Protección.

Stokes, Bauer y Hudson, en 1928, demostraron que el *Macacus rhesus* puede ser protegido de la infección amarilica experimental cuando recibe al mismo tiempo una dosis conveniente de suero de convaleciente de dicha enfermedad. Este fenómeno dió origen al nombre dado a la prueba que investiga la presencia de anticuerpos específicos para el virus de la fiebre amarilla. Fue en esta forma como se practicaron las primeras pruebas de protección que permitieron demostrar la infección amaríli-

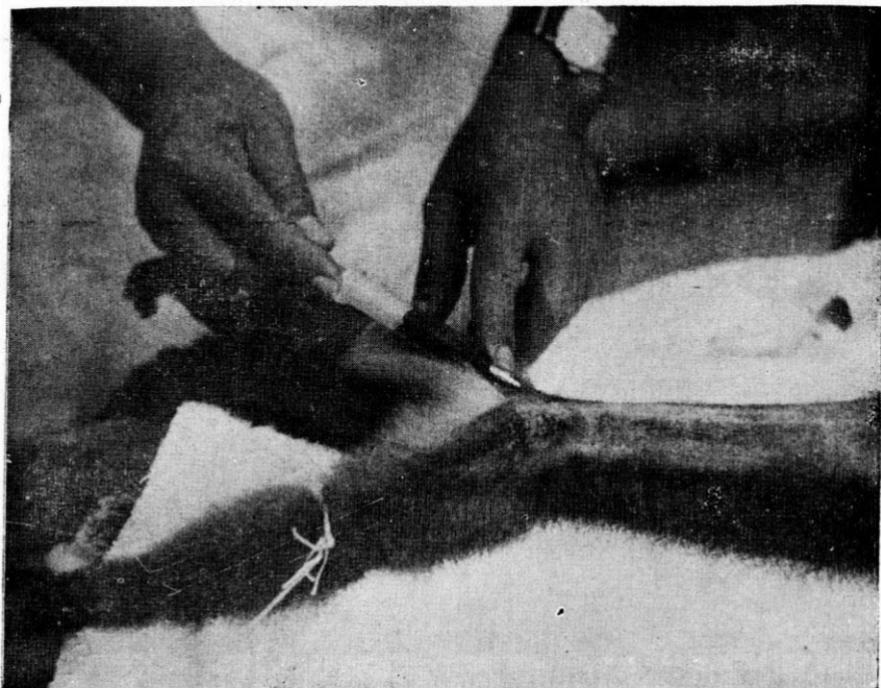


Fig. 9. — Técnica de sangría, usando los vasos femorales, en el Mico *Aotus*.

ca sufrida en México, Brasil y Perú, de 1919 a 1927, y comprobar la identidad inmunológica del virus presente en este Hemisferio con la del Africa Occidental.

Después del hallazgo de la susceptibilidad del ratón blanco al virus de la fiebre amarilla, Theiler demostró, en 1931, el poder protector del suero de convaleciente de esta enfermedad para el ratón blanco, cuando una mezcla en partes iguales de suero inmune y virus neurotrópico era inculada intrecerebralmente a dicho animal. Esta prueba, que permitía distinguir

un suero inmune de otro no inmune, presentaba resultados un tanto irregulares debido a la dificultad de calcular anticipadamente una dosis conveniente de virus, y hacía necesario el uso de muchos ratones para obtener un resultado válido al probar un gran número de sueros.

Sawyer y Lloyd, en 1931, obviando los inconvenientes de la técnica anterior, idearon la prueba conocida con el nombre de "Prueba de Protección Intraperitoneal en el ratón blanco". Esta prueba se basa en el hecho de que cuando el ratón blanco es

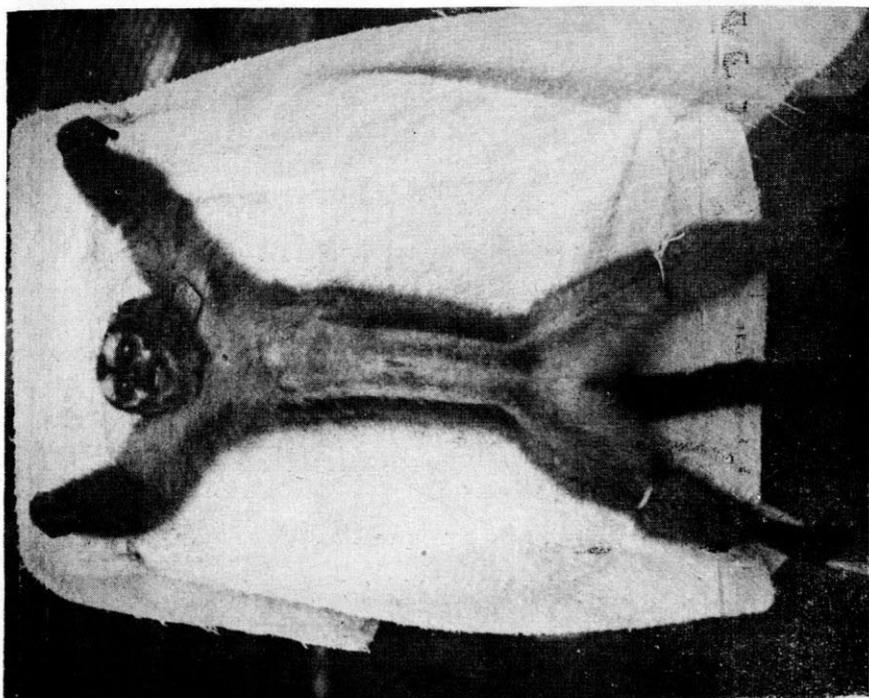


Fig. 10. — Mico Aotus con el pelo del abdomen rasurado, amarrado en posición especial para facilitar la picadura de los mosquitos.

inoculado intraperitonealmente con grandes dosis de virus neurotrópico, éste entra al torrente sanguíneo y si al mismo tiempo el animal ha sido irritado intracerebralmente por medio de una inyección inocuándose el virus es así fijado en el cerebro desarrollándose una encefalitis mortal. En la práctica, esta prueba consiste en la inoculación intra-peritoneal a ratones blancos adultos de 0.6 c.c. de una mezcla de dos partes de suero por probar (3.0c.c.) y una parte de virus fresco neurotrópico Francés (1.5 c.c. de una suspensión cerebral al 10% en suero fi-

siológico). Los ratones inoculados deben haber recibido momentos antes una inyección intracerebral de 0.03 c.c. de una suspensión de almidón al 2% en suero fisiológico. Los controles de sueros normales e inmunes, ya conocidos, como también el correspondiente control del virus usado, hacen parte integrante de la prueba.

En 1933 Theiler modificó la técnica original de su prueba de protección y obtuvo mejores resultados, aunque siempre era



Fig. 11. — Estantería de metal donde se guardan las cajas con los ratones infectados.

necesario el uso de un gran número de ratones. Bugher, 1940, hizo una revisión de la prueba de Theiler, introduciendo una técnica especial en la desecación del virus neurotrópico que dá mayor estabilidad al virus, es decir, menos fluctuaciones en su título. La técnica así mejorada por Bugher, es menos complicada y permite resultados satisfactorios utilizando sólo un grupo de ratones para cada suero por probar. Es esta prueba, así modificada por Bugher, la que se ha generalizado para la investigación de anticuerpos de fiebre amarilla. En la práctica la

prueba consiste en la inoculación intracerebral al ratón blanco adulto de 0.03 c.c. de una mezcla, en partes iguales, de suero por probar y virus neurotrópico (0.3 c.c. de suero y 0.3 c.c. de dilución de virus), en una dilución conveniente de acuerdo con el título pre-establecido del lote del virus en uso, calculando dar a los ratones inoculados alrededor de 100 D.M.L.R. La mezcla suero-virus es incubada durante 2 horas a la temperatura de 27° C. antes de ser inoculada. Lo mismo que en la prueba intraperitoneal, la intracerebral exige los correspondien-



Fig. 12. — Dedales de vidrio donde se colocan individualmente los mosquitos infectados.

tes controles de sueros normales e inmunes, así como los del virus usado.

En ambas pruebas los ratones son observados durante 10 días; los resultados son expresados en "protección", lo que quiere decir que en el quebrado que indica el resultado de cada grupo de ratones, el numerador representa el número de ratones que *sobrevivieron*. Es de gran importancia en las pruebas de protección el investigar en cada grupo de ratones el llamado

"A. S. T.", de la expresión en inglés "average survival time", o sea, el promedio de supervivencia de los ratones en cada grupo.

Declarada "satisfactoria" la prueba, es decir, que tanto los resultados de los sueros-contrroles como el del virus usado están en regla, se hace la interpretación de los sueros incluidos en ella. Cuando en un grupo de ratones, por cualquier causa accidental, sea necesario descartar más de dos animales, el suero correspondiente a dicho grupo es declarado "no satisfactorio" y debe ser repetido.

Rutinariamente son declarados francamente positivos los sueros con un resultado de: 4/4, 5/5, 6/6, 4/5 y 5/6 con un "AST" que oscile entre 8.8 a 10.0; sueros con un resultado de 0/4, 0/5, 0/6, 1/5 y 1/6 con un "AST" que oscile entre 5.0 a 6.3, son considerados como verdaderos negativos. Para la interpretación de los resultados intermedios es necesario un análisis especial de la prueba, así como también el estudio de muchos otros factores que, por no creerlos necesario en el presente artículo, no entramos a considerarlos y dejamos que el lector consulte para mayores detalles las referencias citadas.

La prueba de protección intracerebral tiene la ventaja, sobre la intraperitoneal de ser mucho más sensible y poder ser practicada con cantidades muy pequeñas de suero, pero la intraperitoneal es mucho más específica, siendo ésta la que casi siempre se usa en la investigación de anticuerpos en el hombre.

Uso de monos y micos.

Después del hallazgo hecho por Bauer y Hudson (1928) de la susceptibilidad del *Macacus rhesus* al virus amarílico, se iniciaron los estudios de susceptibilidad de las diferentes especies de primates, tanto del Africa como de la América del Sur, confirmandose que todas ellas presentan cierto grado de susceptibilidad al virus. Davis (1930a, 1930b, 1930c, 1931), y Davis y Shannon (1929) estudiaron una gran serie de micos brasileños y encontraron las especies de *Saimiri*, *Callithrix* y *Leontocebus* especialmente susceptibles. Laemert (1944) hizo un estudio detenido del comportamiento del virus en *Callithrix* y *Leontocebus*, y Waddell y Taylor (1945) mantuvieron ciclos de virus en micos *Callithrix* empleando como vectores *Aedes aegypti* y *Haemagogus equinus*. En el laboratorio de Villavicencio se comprobó la susceptibilidad de varios micos colombianos de los cuales *Saimiri* (Bates, 1944a), *Aotus* (Bates y Roca, 1945b) y *Oedipomidas* (Bates y Roca, 1946) eran especialmente susceptibles. Con estas tres especies y como vector el *Haemagogus spe-*

gazzinii, fue posible mantener el virus amarílico en ciclos constantes de primates-mosquitos-primates durante todo un año hasta completar 14 ciclos (Bates y Roca, 1946).

Es el *Aotus* tal vez el primate más susceptible de Colombia al virus de la fiebre amarilla, pues este animal reacciona en una forma semejante al *Macacus rhesus*. En nuestros estudios sobre esta especie se ha confirmado que animales infectados por medio de picaduras de mosquitos, han muerto, después de presentar en su torrente sanguíneo virus circulante con título semejante al presentado por los rhesus inoculados con virus Asi-bi y mostrando el 90% de ellos lesiones de fiebre amarilla en el hígado, tan típicas como las mostradas por el hombre que ha sucumbido a esta enfermedad.

El *Saimiri* presenta, tal vez en un 5%, lesiones de fiebre amarilla, pero no tan típicas como las mostradas por el *Aotus*. Además de la susceptibilidad especial demostrada por estas dos especies para el virus amarílico, tienen ellas la ventaja de ser de fácil manejo en las rutinas de laboratorio y de adaptarse fácilmente a las condiciones de cautividad.

Los *Saimiris* y *Aotus* usados en este laboratorio fueron comprados a personas distintas que los capturaron en las regiones vecinas a Villavicencio, Restrepo y Acacias. A cada ejemplar adquirido por el laboratorio se le asignó el correspondiente número de orden, el cual fué tatuado en ambas orejas, y para mayor comodidad se le fijó al cuello una pequeña placa de aluminio o de bronce con el mismo número. Una ficha para cada animal es llevada cuidadosamente, con entradas de todos los detalles concernientes tanto al espécimen como a toda la experimentación (véase Fig. 14). Anotaciones a mañana y tarde de la temperatura rectal son hechas durante los primeros 10 días de la experimentación.

La mayor parte de los *Saimiris* fueron infectados por medio de inyección subcutánea, intramuscular o intra-peritoneal de virus. Un gran número de estos mismos animales fue infectado también por medio de picadura de *Haemagogus spegazzinii*, infectados con virus amarílico en el curso de los estudios de la confirmación de este mosquito como verdadero vector selvático (Bates y Roca, 1945a). Todos los *Aotus* experimentados fueron infectados mediante picadura de *Haemagogus spegazzinii* (Bates y Roca, 1945b y 1946).

Al iniciarse cualquier experimento el animal es sangrado de los vasos femorales (Fig. 9) y su suero guardado como control pre-experimental. La determinación de la presencia de virus en el torrente sanguíneo, es practicada desde el tercero hasta el séptimo día de haber sido inoculado o expuesto a las

picaduras de los mosquitos infectados. Sangrado el animal de los vasos femorales, obtenidos 2.0 cc. de sangre y una vez formado el coágulo sanguíneo, por medio de la centrifugación, se separa el suero con el cual se practican las correspondientes diluciones, desde 10^{-1} a 10^{-6} para la titulación del contenido del virus.

La investigación de inmunidad para la fiebre amarilla se practica en todos los ejemplares pocos días después de haber llegado al laboratorio; solamente animales con resultados negativos son usados en los experimentos de transmisión o de susceptibilidad para el virus. Todos los animales sobrevivientes en la experimentación son sangrados de 21 a 30 días después de haber sido expuestos a la infección. Los sueros pre y post-experimentación son luego sometidos a la prueba de protección intracerebral en el mismo "run", siguiendo la técnica de Bugher.

Los animales que mueren en el curso de la experimentación son autopsiados y una muestra de hígado, conservada en formol al 10% en solución salina al 0.9%, es remitida a Bogotá para el correspondiente estudio histo-patológico.

Aislamiento de Virus.

En el hombre enfermo de fiebre amarilla es posible demostrar la presencia del virus en el torrente sanguíneo, desde un poco antes de presentarse los primeros síntomas de la enfermedad, hasta el 5º día de ella; el virus circula en mayor concentración durante los 3 primeros días. Casi siempre el aislamiento se hace por medio de la inoculación intracerebral del suero del enfermo a ratones adultos, por la gran facilidad de poder llevar estos animales hasta el lugar donde se encuentra el paciente; también puede hacerse en el rhesus o en micos Sudamericanos (Saimiri, Aotus). Estos animales pueden ser inoculados subcutánea o intra-peritonealmente con el suero o la sangre total. Una vez inoculados los ratones o los micos, éstos deben ser enviados al laboratorio para su observación; cuando se trate de micos, la jaula de éstos debe ser protegida con anejo a fin de evitar la posible infección de mosquitos. Cuando el enfermo no se encuentra muy lejos del laboratorio, es posible tomar sangre en vénulas que deben ser transportadas en termos con hielo para asegurar la vitalidad del virus.

Los ratones así inoculados, de acuerdo con la concentración del virus en el momento de la sangría del enfermo, pueden mostrar los primeros síntomas desde el 7º día de inoculación: erizamiento, excitabilidad, presentándose la parálisis uno

o dos días después. El número de ratones que enferma está en relación con el título del virus inoculado; cuando éste es bajo, el período de incubación puede prolongarse hasta 21 días o más; y en algunas ocasiones los síntomas son tan ligeros, que pueden escapar a la observación de una persona de poca práctica en trabajos de virus; así, pues, ante síntomas sospechosos de cualquiera de los ratones inoculados, se practica el correspondiente pase de confirmación del agente infeccioso aislado, a nuevos grupos de ratones. El ratón sospechoso se mata con cloroformo y extraído el cerebro asépticamente (Figs. 5, 6, 7, 8) es triturado en un mortero con suero fisiológico en cantidad suficiente para obtener una suspensión cerebral al 10% (un cerebro de ratón tiene un promedio de peso de 0.30 grs); centrifugada esta suspensión por 15 minutos a 1.500 r.p.m., el sobrenadante es usado para la inoculación. El virus puede ser conservado así indefinidamente mediante pases sucesivos a nuevos grupos de ratones pero generalmente se preserva mediante la desecación, o en glicerina al 50% en solución salina. Más adelante hablaremos sobre estas técnicas.

El desarrollo de una encefalitis en los ratones inoculados con el suero proveniente de un enfermo sospechoso de sufrir la fiebre amarilla, no es suficiente para afirmar con certeza que se ha aislado el virus amarílico pues son muchos los virus con propiedades neurotrópicas que, inoculados intracerebralmente en ratones blancos, pueden desarrollar una encefalitis. Así, pues, una vez confirmado que en los ratones inoculados se ha fijado un agente infeccioso, es necesario comprobar que es un virus y que éste es en verdad *virus de fiebre amarilla*. Cuando la manipulación de la sangría del enfermo e inoculación de los ratones han sido practicadas con la asepsia requerida, en muy pocas ocasiones se presenta una infección bacteriana, pero cuando ésta se presenta, puede ser fácilmente descartada debido a los síntomas presentados por los ratones; asimismo, al practicar el pase de confirmación del agente aislado, los resultados de la siembra de la suspensión cerebral pueden indicar la infección bacteriana, lo mismo que la presencia de bacterias en las preparaciones de impresiones cerebrales procedentes de los ratones enfermos; como rutina, casi siempre al practicarse el pase de confirmación, se inoculan, cuando menos, dos grupos de ratones: uno, con el material centrifugado y otro, con material filtrado por Seitz E. K. Cuando las investigaciones bacteriológicas han sido negativas y el agente infeccioso ha pasado por el filtro, ello indica que se está en presencia de un agente filtrable, pero queda por confirmar que el virus es

el de la fiebre amarilla; esta confirmación se practica por medio de la llamada "Prueba de Especificidad".

Cuando la tentativa de aislamiento de virus ha sido hecha en el rhesus o en uno de los micos *Aotus* o *Saimiris* el virus puede aislarse de su sangre. De acuerdo con la dosis inoculada, el período de incubación oscilará entre dos y seis días; en el *Saimiri*, que no es tan susceptible, el período de incubación será un poco más demorado. El principal síntoma es la fiebre que se presenta generalmente desde el tercer día, llegando hasta 40.5° C., en el rhesus y el *Aotus*. Esta temperatura permanece alta por unos tres o cuatro días, con oscilaciones de uno a medio grado de la mañana a la tarde; cuando la temperatura de la mañana es de 40.0° C., es éste un buen síntoma de infección. Otro de los síntomas que puede presentarse en estos animales es la ictericia, la cual puede ser apreciada muy bien en el suero sanguíneo, conjuntivas oculares y en las orejas de los rhesus y *Saimiris*, síntoma que se presenta generalmente del 4° día en adelante.

La presencia del virus circulante es positiva desde el 3° o 4° día de la inoculación hasta el 7°; pero en algunas ocasiones puede prolongarse hasta el 9° o 10° día. La concentración o título más alto del virus se presenta en la mayoría de las veces entre el 4° y el 6° día.

En las infecciones fatales la muerte se presenta generalmente del 4° al 7° día de la inoculación, con algunas excepciones después de este último. Los hallazgos de autopsia son completamente típicos en la mayoría de los rhesus: tinte icterico de las serosas, hígado grande y de color de tabaco o gamuza, estómago con abundantes residuos hemorrágicos y equimosis del tejido submucoso, bazo y riñones congestionados. Los *Aotus* y *Saimiris* presentan algunas veces un hígado del mismo aspecto que el presentado por el del rhesus, y escasos residuos hemorrágicos en el estómago. En cuanto a las lesiones histopatológicas del hígado, son típicas tanto en el rhesus como en el *Aotus*; en el *Saimiri* se encuentran en un porcentaje muy bajo (tal vez un 5%).

Inoculado uno de estos animales con la sangre de un enfermo sospechoso de fiebre amarilla, se inicia la investigación de virus circulante por medio de la inoculación de su suero sanguíneo al ratón blanco a partir del 3er. día. Si en el 4° y 5° días los síntomas presentados por el animal inoculado son sospechosos, el virus puede ser conservado mediante la desecación del suero sanguíneo en uno de esos días. Con los ratones ya inoculados pueden seguirse las manipulaciones anotadas cuan-

do se habló del aislamiento del virus en dichos animales. Para la confirmación del virus aislado como virus de fiebre amarilla hay que practicar la correspondiente prueba de especificidad. También se puede confirmar, con la autopsia y el estudio histo-patológico del hígado en las infecciones fatales de los *Aotus* y rhesus; y en las no mortales, por medio de la prueba de protección en el suero sanguíneo de una muestra de sangre tomada antes de la inoculación y otra 30 días después de ella; si se trata de una infección por fiebre amarilla, la primera muestra debe ser negativa y la segunda, positiva; cuando ambas son negativas, seguramente el virus aislado corresponde a otro agente infeccioso, lo cual será también confirmado por la prueba de especificidad.

Preservación del Virus.

El virus de la fiebre amarilla pierde su actividad muy fácilmente y, por tanto, es difícil poderlo conservar en estado activo sin ser sometido a una técnica especial. Rápidamente pierde su virulencia cuando se conserva en una suspensión pobre en contenido proteínico, y aún en un medio de alta concentración proteínica, tal como el suero sanguíneo puro, el virus pierde gradualmente su actividad. El grado de dicha pérdida depende de la temperatura a que sea conservado: cuanto más alta sea ésta, mucho más pronto el virus es destruido. La oxidación tiene una influencia muy marcada: así, el virus contenido en el suero sanguíneo proveniente de un enfermo de fiebre amarilla, conservado a la temperatura ambiente y expuesto al aire, es inactivo a las 48 horas; mientras que en el mismo suero conservado en iguales condiciones pero cubierto con una capa de vaselina, el virus conserva su actividad por 6 días.

Después del hallazgo de la susceptibilidad del *Macacus rhesus* al virus de fiebre amarilla, se iniciaron las investigaciones con el fin de poder conservar este virus *in vitro* (Sawyer, Lloyd y Kitchen, 1928). Las primeras tentativas se hicieron con sangre e hígado provenientes de rhesus infectados: sangre citratada al 2%, sangre coagulada, sangre-glicerina al 50%, hígado en pedazos pequeños o triturado, conservado en solución de Locke y glicerina al 50%; siendo conservadas todas las preparaciones en nevera (4^o C.). El más satisfactorio de estos métodos fue el de la glicerina, en el cual el virus sobrevivió por 60 días. También se ensayó el hígado congelado; en esta forma el virus sólo se conservó activo por espacio de 30 días.

Después de los resultados anteriores, Sawyer, Lloyd y Kitchen ensayaron el método de la desecación al vacío, congelándose previamente el material por desecar.

En la técnica usada por Sawyer, Lloyd y Kitchen se requieren los aparatos siguientes: desecador del tipo "Hempell", de 15 a 20 cms. de diámetro interior, provisto de una rejilla circular para tubos de 10 a 12 mm. de diámetro, una bomba eléctrica para el vacío (Cenco Hyvac) y tambor de gas carbónico con el correspondiente aditamento para la confección de panes de nieve carbónica. El desecador es preparado 24 a 48 horas antes de iniciar la desecación: en la tapa se ponen 150 a 200 c.c. de ácido sulfúrico concentrado, de acuerdo con la capacidad del aparato; después de taparlo convenientemente, aplicando grasa suficiente para asegurar un cierre perfecto, se practica un poco de vacío y luego se coloca en un recipiente que contiene una mezcla de hielo machacado y sal común, mezcla que debe cubrir el desecador hasta el nivel de la tapa. Preparado en esta forma se coloca dentro de una refrigeradora y así se consigue un enfriamiento a una temperatura de 5 a 10 grados bajo cero. Para mejor control, con anticipación, se coloca un termómetro dentro del desecador.

Supongamos que se trata ahora de preservar el virus proveniente de un mono que ha sido infectado. Juzgando por el aspecto del animal en cuanto al grado de infección, el mono es sangrado del 3º al 5º día, y una vez obtenido el suero sanguíneo, éste se pone en cantidad de 0.5 c.c. en tubos de 100 x 10 mm.; mientras se hace lo anterior, en un recipiente pequeño se prepara una mezcla de alcohol absoluto y nieve carbónica; cuando esta mezcla ha tomado un aspecto de jarabe se van introduciendo en ella, hasta la mitad y en grupos de a tres, los tubos ya preparados con el suero por desecar, imprimiéndoles un movimiento rápido de rotación. De uno a dos minutos son suficientes para congelar los tres tubos y, secados del exceso de alcohol-nieve carbónica, van colocándose en el desecador que se tiene destapado y se ha reaprovisionado de hielo para mantenerlo frío. Terminada la congelación de los tubos, el desecador se tapa con los mismos cuidados indicados anteriormente, y se conecta a la bomba de vacío, la cual se pone en funcionamiento por espacio de dos o tres horas, de acuerdo con el número de tubos por desecar. Durante todo este tiempo el recipiente enfriante se mantiene bien provisto de hielo. Terminado el vacío se coloca nuevamente el desecador en la nevera, y al cabo de 24 horas o más, los tubos son sacados y sellados al soplete. Para mejor preservación del virus se puede colocar una

sustancia hidrófila dentro del tubo que lo contiene. Con tal fin se hunde el tapón de algodón hasta la mitad del tubo y se agregan pedacitos de calcio anhidro o "silica gel", y se sella el tubo al soplete. Cuando se trata de preservar virus provenientes de ratones, se prepara una suspensión cerebral (ratones moribundos), del 5 al 10% en suero normal humano o de mono y después de centrifugado por espacio de media hora a 2.000 r.p.m., el sobre-nadante es sometido a la técnica ya mencionada. Virus preservados en esta forma han permanecido activos hasta por un término de 10 años en los laboratorios de la Fundación Rockefeller en New York.

Más tarde, con el hallazgo de la vacuna contra la fiebre amarilla, el método anterior fue perfeccionado al emplearse la técnica ideada por Bauer y Pickels (1940), técnica ésta muy superior, ya que permite una desecación mucho mejor pues con ella se obtiene un material con un grado de humedad menor al 4% y, al mismo tiempo, se sellan las ampollitas o tubos después de haber recibido gas nitrógeno seco sin que el material entre en contacto con el aire exterior. Tanto el porcentaje de humedad del material desecado como la presencia de nitrógeno son factores de capital importancia para la preservación del virus porque se ha demostrado (Fox y Gard, 1940) que la duración de la actividad del mismo está en razón inversa del grado de humedad del producto desecado y que, asimismo, la actividad decrece más rápidamente cuando el material desecado ha sido sellado en presencia de aire que cuando lo ha sido en presencia de nitrógeno. No describimos esta técnica por no considerarla de importancia para el presente artículo.

Manipulación de mosquitos en el Laboratorio.

Para los experimentos de transmisión, en el laboratorio de Villavicencio se usaron generalmente especímenes de *Haemagogus spegazzinii* capturados con 12 a 24 horas de anticipación en bosques vecinos a la población. Los mosquitos fueron transportados al laboratorio individualmente en tubos de ensayo (para tal fin se encontraron apropiados tubos de 100 mm. x 10 mm.), y conservados luego en un lugar fresco hasta el momento de ser infectados. Se encontró conveniente el ingurgitar los mosquitos uno a uno en los animales fuentes de virus, manteniendo tales animales atados a una tabla especial. Los mosquitos parecen ingurgitarse mejor en las palmas de las manos o en las plantas de los pies de los animales, posiblemente debido a la mayor irrigación sanguínea en estas regiones; cuando se trata de ingurgitar un gran número de ejemplares,

es mucho mejor usar el abdomen del animal, región que debe haber sido previamente afeitada en seco (véase Fig. 10). El tapón de algodón es quitado y el tubo es invertido hacia la piel del animal; tan pronto como el mosquito ha principiado a picar, el tubo es retirado, dejando el mosquito libre, lo que facilita el tomar otro mosquito. La manipulación se lleva a cabo en un cuarto aislado del laboratorio, en donde se ha armado una jaula de anejo, evitándose en esta forma toda posibilidad de fuga de los mosquitos. A medida que los mosquitos se van ingurgitando, éstos vuelan hacia el anejo donde pueden capturarse nuevamente. En esta forma los mosquitos son manipulados individualmente y hay la certeza de que cada ejemplar realmente se ha ingurgitado.

Para la ingurgitación de mosquitos ha sido costumbre usar jaulitas especiales de madera y anejo en un diseño adecuado, que permite el ser colocadas directamente sobre el abdomen del animal que sirve como fuente de virus o simplemente como fuente de sangre normal; también en otras ocasiones se han usado aparatos muy sencillos, tales como tubos de lámparas, a los cuales se les cierran sus extremidades con gasa; en esta forma, gran número de mosquitos pueden ser manipulados a un mismo tiempo. Sin embargo, nosotros hemos encontrado mucha dificultad al tratar de hacer picar *Haemagogus spegazzinii* usando esta última técnica, y por tanto hubo que recurrir al método del tubo individual. Cuando se trata de especies de mosquitos que son de fácil manejo en el laboratorio, tales como el *Aedes aegypti*, el método de jaulitas sería probablemente mucho más eficiente.

Después de que todos los mosquitos de un lote dado han sido ingurgitados, un número pequeño de ellos (generalmente 5) es tomado al azar para su inmediata inoculación en ratones como "controles" del experimento. Estos mosquitos son triturados separadamente en 0.5 c.c. de agua destilada al 10% de suero normal humano o de mono, e inoculados intracerebralmente en paralelo, en grupos de ratones de 7 días de edad y en adultos. El resultado obtenido de los mosquitos "controles" es tomado como índice de la cantidad de virus recibida por el lote ingurgitado. El resto de los mosquitos es colocado en condiciones de temperatura y humedad especiales, en las cuales serán mantenidos para los experimentos de transmisión.

Para el *Haemagogus spegazzinii* hemos encontrado muy satisfactorio mantener estos mosquitos individualmente en dedales de vidrio con dimensiones de 25 x 50 mm., con fondo plano: los dedales, ya con los mosquitos, son colocados en un soporte

de madera de 30 cm. de largo, que tiene capacidad para 11 dedales en cada lado (Fig. 12). El uso de esta técnica para el mantenimiento de *Haemagogus* adultos ha sido descrita por Osorno (1944) y por Bates y Roca (1945a). Los dedales tienen en el fondo una capa delgada de algodón absorbente cubierta con un disco de papel de filtro, con el fin de evitar que el mosquito se enrede en el algodón; los dedales son tapados con copitas hechas de anejo de aluminio, ajustándose la superficie externa de éstas a la parte interior de aquéllos; en la parte superior de la tapa se coloca un pedazo muy pequeño de algodón embebido en una solución débil de agua azucarada, la cual sirve como fuente intercurrente de alimento. Es muy importante que el algodón del fondo de los dedales sea siempre conservado húmedo, pero en grado tal que no permita la formación de gotas de agua. Los dedales son revisados diariamente y una pequeña cantidad de agua es colocada con una pipeta a los que parecen estar secos. Aparentemente el *Haemagogus spegazzinii* alcanza una máxima longevidad cuando es mantenido en una atmósfera relativamente seca, pero con una fuente de humedad permanente; esto se consigue colocando los dedales en una incubadora, en la cual un abanico eléctrico mantiene una constante circulación de aire. Hemos encontrado que la temperatura constante de 30° C. es la más favorable para la multiplicación del virus en el mosquito, y ésta ha sido usada rutinariamente en todos los experimentos.

Como los mosquitos son mantenidos en dedales separados, es muy fácil llevar la historia de cada uno de ellos. Cada lote de mosquitos infectados recibe el número correspondiente de orden, numerándose individualmente al mismo tiempo los mosquitos que forman dicho lote. Cada dedal lleva un rótulo con el número del lote y el número correspondiente a cada mosquito. Para prueba de transmisión individual de mosquitos, cada uno pica a un ratoncito de 3 días de edad; en esta edad los ratones son altamente susceptibles al virus de fiebre amarilla, inoculados por vía extraneural (Bugher, 1941). Los ratoncitos que han sido picados son dejados con la madre. La caja recibe el correspondiente número de orden, los ratoncitos son marcados en la cola con puntos tatuados con tinta china, tatuándose tantos puntos como sea el número que le corresponde a cada ratoncito; generalmente un grupo de ratoncitos de 3 días de edad, sólo cuenta con unos 4 ó 5 ejemplares, (el último ratoncito, o sea, el 4º o el 5º no es tatuado). En esta forma es posible saber qué ratoncito ha sido picado por determinado mosquito. Para transmisiones en micos u otros mamíferos de mayor tamaño que los

ratoncitos, varios mosquitos pican al mismo tiempo al animal. Como ya dijimos, la historia de cada uno de los mosquitos es llevada cuidadosamente; en esta forma, una vez que los mosquitos de determinado experimento han sido probados en su capacidad transmisora, pueden ser triturados e inoculados intracerebralmente a ratones, a fin de comprobar su contenido de virus, o también pueden ser conservados a voluntad, para nuevas transmisiones.

La presencia del virus en mosquitos infectados puede ser puesta de manifiesto hasta 24 horas después de la muerte natural de ellos; este método suministra a menudo datos de gran utilidad en determinados experimentos. Cuando es necesario matar los mosquitos para la inoculación a ratones, el método usado puede afectar el contenido del virus, tal como ha sido demostrado por Waddell (1945); así, por ejemplo, el cloroformo tiene una fuerte acción virucidal. El ácido cianhídrico, que es altamente mortal para los mosquitos, carece de esta acción. Rutinariamente usamos este último método cuando los mosquitos son matados para ser inoculados como investigación de virus. Un método que encontramos muy satisfactorio para matar mosquitos con ácido cianhídrico, consiste en la preparación de un frasco de regular tamaño y con boca ancha, que permita el paso del dedal que contiene el mosquito, semejante a los usados por los colectores de mariposas. Los mosquitos mueren muy rápidamente y pueden ser triturados sin peligro de escape. Los frascos para matar mosquitos con ácido cianhídrico pueden ser preparados fácilmente, así: unos pocos gramos de cianuro de potasio (dos o tres terroncitos del tamaño de un frijol) son colocados en el fondo del frasco; hecho esto se cubre con 2 o 3 centímetros de aserrín, colocándose luego una capa de yeso de París, la cual se deja secar por unas 24 horas antes de poner en uso dicho frasco. Un frasco preparado en esta forma conserva su potencialidad por muchos meses.

Se debe anotar que el método para la conservación individual de mosquitos, tal como lo hemos descrito antes, es muy adecuado para varias especies de *Haemagogus*, pero no tan favorable para otros, pertenecientes a las especies de *Aedes* o *Psorophora*. Estas especies viven generalmente mucho más tiempo si son conservadas en cajas pequeñas, manteniéndose en ellas una atmósfera húmeda. Al trabajar con diferentes especies de mosquitos, es necesario hacer muchas pruebas en condiciones diferentes para cada una, siendo así que ellas pueden diferir profundamente en las condiciones apropiadas para su mejor conservación.

Resumen.

El presente artículo tiene por objeto describir las técnicas empleadas en el laboratorio de Villavicencio (Meta, Colombia) para el estudio y mantenimiento del virus de la fiebre amarilla. Las características de dicho virus son mencionadas brevemente. Se trata también sobre la susceptibilidad a la fiebre amarilla del ratón blanco de la cepa Albino-Suiza, y se describen las técnicas sobre el empleo de tales animales en los experimentos para averiguar la presencia de virus. Asimismo se explican detalladamente los métodos usados en la titulación de virus y en las pruebas de especificidad y protección. Se hace referencia a la susceptibilidad al virus de la fiebre amarilla presentada por algunos primates colombianos y se habla sobre el empleo que se les da en el laboratorio a tales animales en los estudios sobre virus. Tanto el aislamiento del virus amarillo de casos sospechosos de infecciones humanas como las técnicas usadas para la conservación del mismo, en forma desecada, se describen en el presente artículo, como también los métodos empleados en la manipulación de mosquitos en el laboratorio, haciendo especial referencia a las técnicas adoptadas en los estudios de transmisión con mosquitos de género *Haemagogus*.

SUMMARY

The object of this article is to describe techniques used for the study and maintenance of the virus of yellow fever in the laboratory at Villavicencio, Colombia. The characteristics of yellow fever virus are briefly described. The susceptibility of white mice of the "Swiss" strain is discussed, and the technique of their routine use for tests of the presence of virus described. The methods of virus titration, specificity tests and protection tests are explained in some detail. The susceptibility of Colombian monkeys to yellow fever virus and their use as laboratory animals in virus studies are described. The isolation of yellow fever virus from suspected cases of human infection is discussed and the technique of preserving virus by desiccation described. Methods of handling mosquitoes in the laboratory are described, with special reference to techniques adapted to transmission studies with *Haemagogus* mosquitoes.

D-51560 GRUPO DE RATONES		15	17	19	21	23	25	27	29							
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	6	V	+													
	5	V	V	V	V	V	V	V	V	E	M	+	D-51593			
	4	V	V	V	V	V	V	V	V	E	M	+				
	3	V	V	V	V	V	V	V	V	E	M	+	= 5/5			
	2	V	V	V	V	V	V	V	V	E	M	M	+	A.S.T.		
	1	V	V	V	V	V	V	V	V	E	E	M	+	10.2		
	T	0/6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	2/5	3/5	2/1	1/0			
	ORIGEN DEL VIRUS <i>Asiatic R. 112 - Oct. 10¹</i>															
RAZA DE RATONES <i>Dummys</i> ----- 15.II.45 FECHA																

SIGNOS CONVENCIONALES:

- V = VIVO Y SANO
- E = SOSPECHOSO
- M = ENFERMO
- M = MORIBUNDO
- F = SACRIFICADO
- +

D-56790 GRUPO DE RATONES		22	24	26	28	31	2									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	6	V	V	V	V	V	E	+								
	5	V	V	V	V	V	E	+	= 6/6							
	4	V	V	V	V	V	E	+								A.S.T.
	3	V	V	V	V	V	M	+								5.7
	2	V	V	V	V	V	M	+								
	1	V	V	V	V	V	E	M	+							
	T	0/5	0/6	0/6	0/6	3/6	3/5	1/0								
	ORIGEN DEL VIRUS <i>S.V. (francés) Bogotá - 1. Dic. 10¹</i>															
RAZA DE RATONES <i>Dummys</i> ----- 22.I.46 FECHA																

V-2327 GRUPO DE RATONES		17	19	21	23	25	27	29	31							
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	6	V	V	V	V	V	V	E	E	+						A.S.T.
	5	V	V	V	V	V	V	E	E	M	+	11.3				
	4	V	V	V	V	V	V	E	E	M	M	M	+			
	3	V	V	V	V	V	V	E	E	M	M	M	M	+	= 6/6	
	2	V	V	V	V	V	V	E	E	M	M	M	M	+		
	1	V	V	V	V	V	V	V	V	M	M	M	E	E	M	+
	T	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	5/6	4/5	4/4	3/2	1/1	0			
	ORIGEN DEL VIRUS <i>Vacuna Programa 293 - Dic 10¹</i>															
RAZA DE RATONES <i>Dummys</i> ----- 17.I.45 FECHA																

FIGURA 14.—FORMAS USADAS PARA LLEVAR LAS HISTORIAS DE ANIMALES INOCULADOS CON VIRUS DE FIEBRE AMARILLA

REFERENCIAS

Bates, M.

1944a. - The saimiri monkey as an experimental host for the virus of yellow fever. *Am. J. trop. Med.*, 24: 83-89.

1944b. - Experiments with the virus of yellow fever in marsupials, with special reference to brown and grey masked opossums. *Am. J. trop. Med.*, 24: 91-103.

Bates, M. and M. Roca-García.

1945a. - Laboratory studies of the saimiri-haemagogus cycle of jungle yellow fever. *Am. J. trop. Med.* 25: 203-216.

1945b. - The douroucouli (*Actus*) in laboratory cycles of yellow fever. *Am. J. trop. Med.*, 25: 385-389.

1946. - Experiments with various Colombian marsupials and primates in laboratory cycles of yellow fever. *Am. J. trop. Med.*, in press.

Bauer, J. H. and E. C. Pickels.

1940. - Apparatus for freezing and drying virus in large quantities under uniform conditions. *J. exp. Med.*, 71: 83-88.

Boshell - Manrique, J.

1938. - Informe sobre la fiebre amarilla silvestre en la región del Meta, desde julio de 1934 hasta diciembre de 1936. *Rev. Fac. Med. (Bogotá)*. 6: 407-427.

Bugher, J. C.

1940. - The demonstration of yellow fever antibodies in animal sera by the intracerebral protection test in mice. *Am. J. trop. Med.*, 20: 809-841.

1941. - The use of baby mice in yellow fever studies. *Am. J. trop. Med.* 21: 299-307.

Bugher, J. C., J. Boshell - Manrique, M. Roca-García and R. M. Gilmore.

The susceptibility to yellow fever of the vertebrates of eastern Colombia. I. Marsupialia *Am. J. trop. Med.*, 21: 309-333.

Bugher, J. C., J. Boshell - Manrique, M. Roca - García and E. Osorno Mesa.

1944. - Epidemiology of jungle yellow fever in eastern Colombia. *Am. J. Hyg.*, 39: 16-51.

Davis, N. C.

1930a. - Susceptibility of capuchin (*Cebus*) monkeys to yellow fever virus. *Am. J. Hyg.*, 11: 321-334.

1930b. - The susceptibility of marmosets to yellow fever virus. *J. exp. Med.*, 52: 405-415.

1930c. - The transmission of yellow fever. Experiments with the "woolly monkey" (*Lagothrix lagotricha*), the "spider monkey" (*Ateles ater*) and the "squirrel monkey" (*Saimiri sciureus*). *J. exp. Med.*, 51: 703-720.

1931. - The transmission of yellow fever. Further experiments with monkeys of the new world. *Am. J. trop. Med.*, 11: 113-125.

Davis, N. C. and R. C. Shannon.

1929. - Studies on South American yellow fever. III. Transmission of the virus to Brazilian monkeys. Preliminary observations. *J. exp. Med.*, 50: 81-85.

Fox, J. P. and Sven Gard.

1940. - The preservation of yellow fever virus. *Am. J. trop. Med.*, 20: 447-451.

Kerr, J. A. and L. Patiño Camargo.

1933. - Investigaciones sobre fiebre amarilla en Muzo y Santander. *Rev. Hig. (Bogotá)*. 3: 1-32.

Kumm, H. W., E. Osorno-Mesa and J. Boshell-Manrique.

1946. - Studies on mosquitoes of the genus *Haemagogus* in Colombia. *Am. J. Hyg.* 43: 13-28.

Laemmert, H. W. Jr.

1944. - Susceptibility of marmosets to different strains of yellow fever virus. *Am. J. trop. Med.*, 24: 71-81.

Lynch, C. J. and T. P. Hughes.

1936. - The inheritance of susceptibility to yellow fever encephalitis in mice. *Genetics*, 21: 104-112.

Osorno-Mesa, E.

1944. - Organización de una colonia de *Haemagogus equinus* Caldasia, 3: 39-45.

Reed, L. J. and H. Muench.

1938. - A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27: 493-497.

Sawyer, W. A. and W. Lloyd.

1931. - The use of mice in tests of immunity against yellow fever. *J. exp. Med.*, 54: 533-555.

Sawyer, W. A., W. Lloyd and S. F. Kitchen.

1929. - The preservation of yellow fever virus. *J. exp. Med.*, 50: 1-13.

Soper, F. L., H. A. Penna, E. Cardozo, J. Serafin. Jr., M. Frobi-scher and J. Pinheiro.

1933. - Yellow fever without *Aedes aegypti*. Study of a rural epidemic in the valle de Channaan, Espirito Santo, Brazil. *Am. J. Hyg.*, 18: 555-587.

Stokes, A., J. H. Bauer and N. P. Hudson.

1928. - Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *Am. J. trop. Med.*, 8: 103-164.

Theiler, M.

1930. - Studies on the action of yellow fever virus in mice. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 24: 249-272.

1933. - A yellow fever protection test in mice by intracere-bral injection. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 27: 57-77.

Waddell, M. B.

1945. - Persistence of yellow fever virus in mosquitoes after death of the insect. *Am. J. trop. Med.*, 25: 329-332.

Waddell, M. B. and R. M. Taylor.

1945. - Studies on cyclic passage of yellow fever virus in South American mammals and mosquitoes. I. Marmosets (*Gallithrix aurita*) and cebus monkeys (*Cebus versutus*) in combination with *Aedes aegypti* and *Haemagogus equinus*. *Am. J. trop. Med.*, 25: 225-230.

Whitman, L.

1943. - A modified intraperitoneal protection test for yellow fever based on the greater susceptibility of immature white mice to the extraneural injection of yellow fever virus. *Am. J. trop. Med.*, 23: 17-36.